

Multidrug Resistenz in Tumorzellen: Expression und Regulation MDR-assoziierter Gene

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Biochemie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. rer. nat. Ulrike Susanne Stein
geboren am 20. Februar 1961 in Naumburg / Saale

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
eingereicht am: November 2002
Gutachter: 1. Prof. Dr. Rik J. Scheper
2. Prof. Dr. Albert Roessner

öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 17. Juli 2003

INHALTSVERZEICHNIS

TEIL I _____ **6**

Kapitel 1

Einleitung und Fragestellung

1.	Einleitung	7
1.1	Multidrug Resistenz – eine allgemeine Einführung	7
1.2	ABC-Transporter als Multidrug Resistenz-assoziierte Gene	8
1.2.1	Das Multidrug Resistance Gene 1 - MDR1	9
1.2.2	Das Multidrug Resistance-Associated Protein – MRP1	11
1.2.3	Das Breast Cancer Resistance Protein – BCRP	12
1.3	Das Major Vault Protein MVP als Multidrug Resistenz-assoziiertes Gen	13
2.	Fragestellung	15
3.	Literatur	16

TEIL II _____ **21**

ZYTOSTATIKA- UND ZYTOKIN-REGULIERTE EXPRESSION MDR-ASSOZIIERTER GENE

Kapitel 2 _____ **22**

MDR1 gene expression: evaluation of its use as a molecular marker for prognosis and chemotherapy of bone and soft tissue sarcomas

Stein, U., Shoemaker, R. H., Schlag, P. M.

Eur. J. Cancer 32A: 86-92, 1996

Kapitel 3 _____ **23**

Development and characterisation of novel human multidrug resistant mammary carcinoma lines in vitro and in vivo

Stein, U., Walther, W., Lemm, M., Naundorf, H., Fichtner, I.

Int. J. Cancer 72: 885-891, 1997

Kapitel 4 _____ **24**

Modulation of mdr1 expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of MDR

Stein, U., Walther, W., Shoemaker, R.H.

Br. J. Cancer 74: 1384-1391, 1996

Kapitel 5 _____ **25**

Reversal of multidrug resistance by transduction of cytokine genes into human colon carcinoma cells

Stein, U., Walther, W., Shoemaker, R. H.

J. Natl. Cancer Inst. 88: 1383-1392, 1996

Kapitel 6 _____ **26**

Tumor necrosis factor- α and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP

Stein, U., Walther, W., Laurencot, C.M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J.,

Shoemaker, R.H.

J. Natl. Cancer Inst. 89: 807-813, 1997

Kapitel 7 _____ **27**

IL-2 gene transfer for chemosensitization of multidrug-resistant human colon carcinoma cells

Stein, U., Walther, W., Shoemaker, R.H., Schlag, P.M.

Adv. Exp. Med. Biol. 451: 145-149, 1998

Kapitel 8 _____ **28**

Cytokine-mediated reversal of multidrug resistance

Stein, U., Walther, W.

Cytotechnol. 27: 271-282, 1998

Kapitel 9 _____ **29**

Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC-transporter BCRP/MXR/ABCG2

Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G.L., Lage, H.

Cancer Gene Ther. 9: 579-586, 2002

TEIL III _____ **30**

HYPERTHERMIE-REGULIERTE EXPRESSION MDR-ASSOZIIERTER GENE

Kapitel 10 _____ **31**

Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1

leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters

Stein, U., Jürchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P.M.,

Royer, H.-D.

J. Biol. Chem. 276: 28562-28569, 2001

Kapitel 11 _____ **32**

Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/P-glycoprotein on thermoresistant variants of atypical and classical multidrug resistant cancer cells

Stein, U., Lage, H., Jordan, A., Walther, W., Bates, S.E., Litman, T., Hohenberger, P., Dietel, M.

Int. J. Cancer 97: 751-760, 2002

Kapitel 12 _____ **33**

Hyperthermia for treatment of rectal cancer: evaluation for induction of multidrug resistance gene (mdr1) expression

Stein, U., Rau, B., Wust, P., Walther, W., Schlag, P.M.

Int. J. Cancer 80: 5-12, 1999

Kapitel 13 _____ **34**

Expression of multidrug resistance genes MVP, MDR1, and MRP1 determined sequentially before, during, and after hyperthermic isolated limb perfusion of soft tissue sarcoma and melanoma patients

Stein, U., Jürchott, K., Schläfke, M., Hohenberger, P.

J. Clin. Oncol., 20: 3282-3292, 2002

TEIL IV _____ **35**

ANALYSE MDR-ASSOZIIERTER GENPROMOTOREN UND DEREN THERAPIE-INDUZIERTE REGULATION

Kapitel 14 _____ **36**

Point mutations in the mdr1 promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs

Stein, U., Walther, W., Wunderlich, V.

Eur. J. Cancer 30A: 1541-1545, 1994

Kapitel 15 _____ **37**

Vincristine induction of mutant and wild-type human multidrug-resistance promoters is cell-type-specific dose-dependent

Stein, U., Walther, W., Shoemaker, R.H.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 275-282, 1996

Kapitel 16 _____ **38**

Employment of the mdr1 promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer gene therapy

Walther, W., Wendt, J., Stein, U.

Gene Ther. 4: 544-552, 1997

Kapitel 17 _____ **39**

mdr1 promoter-driven tumor necrosis factor- α expression for a chemotherapy-controllable combined in vivo gene therapy and chemotherapy of tumors

Walther, W., Stein, U., Fichtner, I., Alexander, M., Shoemaker, R.H., Schlag, P.M.

Cancer Gene Ther. 7: 893-900, 2000

Kapitel 18 _____ **40**

Use of the human MDR1 promoter for heat-inducible expression of therapeutic genes

Walther, W., Stein, U., Schlag, P.M.

Int. J. Cancer 98: 291-296, 2002

Kapitel 19 _____ **41**

Cloning and initial analysis of the human multidrug resistance-related MVP/LRP gene promoter

Lange, C., Walther, W., Schwabe, H., Stein, U.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 278:125-133, 2000

Kapitel 20 _____ **42**

YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of major vault protein (MVP) gene

Stein, U., Bergmann, S., Scheper, R.J., Royer, H.-D., Schlag, P.M.,

Walther, W.

eingereicht, 2002

TEIL V _____ **43**

Kapitel 21

Zusammenfassung der Ergebnisse, Diskussion und Wertung

1. **Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion** _____ **44**
 - 1.1 Zytostatika- und Zytokin-regulierte Expression
MDR-assoziiierter Gene _____ 44
 - 1.2 Hyperthermie-regulierte Expression MDR-assoziiierter Gene _____ 49
 - 1.3 Analyse MDR-assoziiierter Genpromotoren und deren
Therapie-induzierte Regulation _____ 53
2. **Zusammenfassende Wertung** _____ **59**

DANKSAGUNG _____ **62**

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG _____ **63**

TEIL I

Kapitel 1

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1. Einleitung

1.1. Multidrug Resistenz – eine allgemeine Einführung

Aufgrund der Inzidenz und Mortalität maligner Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland kommt deren Prävention, Diagnose und Therapie ein hoher Stellenwert zu. Allein im Jahr 1999 starben 210837 Menschen an Krebs. Damit entfallen 25,1% aller Todesfälle auf maligne Erkrankungen.

Innerhalb der multimodalen Therapieprotokolle repräsentiert der Einsatz von Chemotherapeutika einen unverzichtbaren Bestandteil der Behandlung von Krebserkrankungen, und ist gegenwärtig die effektivste Therapieoption für bereits metastasierte Tumore (Gottesman et al., 2002a; Borst et al., 2002). Ein Teil der Patienten kann auf diesem Wege erfolgreich behandelt werden, während andere Patienten auf dieselbe Behandlung nur unzureichend, nur vorübergehend oder gar nicht ansprechen. Somit ist der Erfolg einer Chemotherapie oft durch Resistenzen gegenüber den eingesetzten Zytostatika limitiert. Diese Chemoresistenzen sind entweder bereits intrinsisch vorhanden, oder sie werden während der Behandlung entwickelt bzw. verstärkt (Abolhoda et al., 1999; Gottesman, 2002b).

Antworten auf diese Beobachtungen der Patienten-individuellen Chemoresistenz sind ebenso komplex wie die Vielzahl unterschiedlicher, parallel oder sequentiell auftretender Resistenzmechanismen. Die molekularen Mechanismen für die Ausbildung einer Chemoresistenz werden hinsichtlich folgender Effekte diskutiert: i. Reduktion der intrazellulären Zytostatika-Konzentration durch Änderungen von Influx, Efflux und/oder Sequestration, wobei die vorwiegende Ursache für die Entwicklung dieses Chemoresistenz-Mechanismus in erhöhtem Drug-Efflux durch ATP-abhängige, membranständige Proteinpumpen besteht; ii. alterierte Zytostatika-Zielproteine, wie z.B. Topoisomerase I und II, Tubuline; iii. erhöhte intrazelluläre Detoxifikation von Zytostatika durch zytoplasmatische Proteine wie z.B. Glutathion-S-Transferasen; iv. gesteigerte Reparatur von DNA-Schäden, wie z.B. durch nukleäre Genprodukte der „DNA-mismatch repair“-Gene; und v. Blockade der Apoptose wie z.B. durch Zytostatika-induzierte Expression antiapoptotisch wirkender Proteine (Gottesman et al., 2002a; Gottesman 2002b; Borst et al., 2002).

Trotz der Vielzahl der möglichen Mechanismen erlangte dennoch ein Resistenzmechanismus in den letzten beiden Dekaden eine ganz außerordentliche Bedeutung: der Mechanismus der simultanen Resistenz gegenüber strukturell und

funktionell nicht-verwandten zytotoxischen Verbindungen, bezeichnet als Arzneimittel-Vielfachresistenz oder Multidrug Resistenz (MDR). Die Ausprägung einer MDR wird durch die Expression einer Reihe von MDR-assoziierten Genen verursacht. Hierbei stehen insbesondere die Gene, die für die ATP-abhängigen Drug-Efflux-Pumpen kodieren (ATP-binding cassette-transporter, ABC-Transporter) im Mittelpunkt des Interesses (Ambudkar et al., 1999; Borst et al., 2002; Gottesman et al., 2002a).

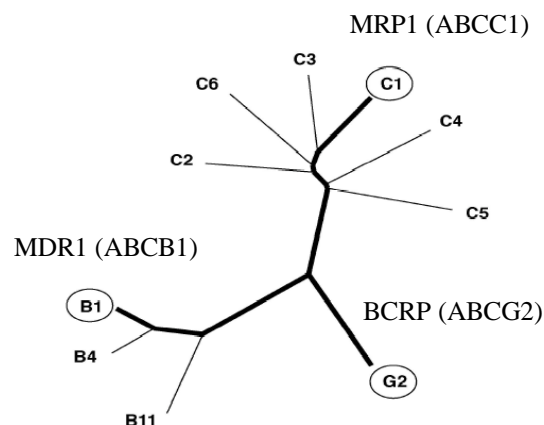
1.2 ABC-Transporter als Multidrug Resistenz-assoziierte Gene

Die Superfamilie der ABC-Transporter repräsentiert mit 48 bekannten und putativen Mitgliedern die größte Genfamilie transmembraner Proteine (Dean et al., 2001) und beinhaltet auch jene, die durch Bindung von ATP an Nukleotid-Bindungsstellen eine Vielzahl unterschiedlicher Zytostatika durch extra- und intrazelluläre Membranen translozieren. ABC-Transporter-vermittelte Chemoresistenzen resultieren prinzipiell aus deren Fähigkeit, verschiedene Klassen von Zytostatika aus der Zelle zu schleusen und somit deren effektive intrazelluläre Konzentration zu vermindern; die Zelle wird resistent (Ambudkar et al., 1999).

Zu diesen MDR-assoziierten Genen zählen die folgenden, für ABC-Transporter kodierenden Gene: Multidrug Resistance Gene 1 (MDR1), Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (kodieren für die Multidrug Resistenz-assoziierten Proteine 1 bis 7), sowie das Breast Cancer Resistance Protein BCRP/MXR/ABCP (kodiert für ein identisches Protein; unterschiedliche Nomenklatur aufgrund zeitgleicher Entdeckung durch drei unterschiedliche Gruppen).

Die phylogenetische Analyse der bekannten humanen ABC-Transporter führte zu einer Klassifizierung in 7 Subfamilien. In Abb. 1 ist die Verwandtschaft der Subfamilien ABCB, ABCC, und ABCG, sowie die deren Mitglieder mit den jeweiligen MDR-assoziierten Hauptvertretern MDR1 (ABCB1; für die ABCB-Subfamilie), MRP1 (ABCC1; für die ABCC-Subfamilie), und BCRP (ABCG2; für die ABCG-Subfamilie) gezeigt.

Abb.1.
Phylogenetischer Baum der
MDR-assoziierten ABC-
Transporter MDR1, MRP1
und BCRP
Abbildung mit freundlicher
Genehmigung von B. Sarkadi,
Universität Budapest, Ungarn



Für diese drei Proteine – MDR1/P-Glykoprotein, MRP1 und BCRP – wurde die kausale Rolle zur Generierung eines MDR-Phänotyps in vitro gezeigt; für weitere MDR-assoziierte ABC-Transporter wie MRP2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4) und MRP5 (ABCC5) wurde die Fähigkeit zum Drug-Transport nachgewiesen; ihre kausale Rolle im Kontext einer MDR ist noch zu untersuchen (Ambudkar et al., 1999; Dean et al., 2001; Borst et al., 2002; Gottesman et al., 2002a).

Das hauptsächliche Zytostatika-Spektrum dieser Transporter umfasst Anthrazykline wie Doxorubicin und Daunorubicin, Mitoxantron, Vinca Alkaloide wie Vincristin und Vinblastin, Epipodophyllotoxine wie Etoposid, und Taxane wie Taxol. Die Spezifitäten der ABC-Transporter für die transportierten Substrate sind zwar überlappend, aber keineswegs identisch. Darüber hinaus können die Substratspezifitäten bestimmter Proteine in Abhängigkeit definierter Punktmutationen variieren (Ambudkar et al., 1999; Honjo et al., 2001; Hrycyna et al., 2001; Litman et al., 2001; Allen et al., 2002; Borst et al., 2002).

Ein weiterer, jedoch ABC-Transporter-unabhängiger MDR-assoziierte Resistenzmechanismus besteht in der subzellulären Redistribution von Substanzen, z.B. im nukleozytoplasmatischen Transport durch Vaults. Der Hauptbestandteil dieser Zellorganellen ist das Major Vault Protein (MVP), welches ursprünglich als das Lung Resistance Protein (LRP) in diesem Kontext identifiziert wurde. Dieser Mechanismus wird eingehend unter 1.3 vorgestellt.

1.2.1 Das Multidrug Resistance Gene 1 - MDR1

Die Subfamilie ABCB der ABC-Transporter beinhaltet 11 Mitglieder, deren prominentester Vertreter das vor inzwischen zwei Dekaden identifizierte MDR1-Gen (ABCB1) ist. Dieses Gen kodiert für das Genprodukt P-Glykoprotein mit 12 transmembranen Regionen und zwei Nukleotid-Bindungsstellen (Abb. 2). Durch das P-Glykoprotein werden hydrophobe, neutral oder positiv geladene Substrate aus der Zelle transportiert. Es ist der erste klonierte humane ABC-Transporter, für den direkt durch Transfektion die Generierung des MDR-Phänotyps in Tumorzellen gezeigt wurde (Juliano et al., 1976; Riordan et al., 1979; Ueda et al., 1987; Ambudkar et al., 1999; Gottesman et al., 2002a).

In einer enormen Vielzahl von Studien wurden MDR1-Genexpressionen in normalen Geweben untersucht. Auffällig war, dass neben nachweisbaren Expressionen in fast allen untersuchten Geweben extrem hohe Expressionslevel in Geweben mit exkretorischer oder sekretorischer Funktion, wie z.B. im Kolon oder in der Niere,

nachgewiesen wurden. In den entsprechenden malignen Geweben wurden dann auch erhöhte MDR1-Expressionsniveaus gezeigt; ein wesentlicher Grund für die z.B. erheblich eingeschränkte Auswahl von Zytostatika zur Behandlung des Kolonkarzinoms (Fojo et al., 1987; Goldstein et al., 1989; Litman et al., 2001; Gottesman et al., 2002a).

Neben der bereits intrinsisch vorhandenen MDR1-Expression können externe Faktoren, die auch Bestandteil der multimodalen Krebstherapie sein können, in Induktionen der MDR1-Genexpression resultieren. Zu den Therapie-assoziierten Induktoren zählen insbesondere Zytostatika, aber auch Hitze oder Strahlung können zu MDR1-Expressionssteigerungen führen (e.g. Kohno et al., 1989; Chin et al., 1990; Kioka et al., 1992; Chaudhary et al., 1993). Durch die Identifizierung des MDR1-Genpromotors und der Generierung von MDR1-Promotordeletionsvarianten konnten diese Induktionseffekte über definierte Sequenzfragmente bzw. -motive des MDR1-Genpromotors nachgewiesen werden (Scotto et al., 1998; Labialle et al., 2002). Unterschiedliche Studien zeigten, dass etwa in der Hälfte aller behandelten Tumoren mit einer induzierten MDR1-Genexpression zu rechnen ist (Hrycyna et al., 2001).

Für eine Reihe von Tumorentitäten, wie z.B. für Weichgewebs- und Knochentumore, Mammakarzinome, aber auch für nicht-solide hämatogene maligne Erkrankungen wie für die akute myeloische Leukämie, wurde die MDR1-Genexpression mit dem Ansprechen auf Chemotherapie korreliert (e.g. Chan et al., 1990; Baldini et al., 1995; Trock et al., 1997, Leith et al., 1999). Diese Beobachtungen gaben Anlass zu folgender optimistischen Annahme: „The high hope of P-glycoprotein was that here was a single protein that confers resistance to a whole array of structurally unrelated anti-cancer drugs. That was a very attractive idea. It raised the possibility that drug resistance could be overcome, because if a single mechanism is responsible, all you have to do is to learn to understand that mechanism, find strategies to overcome it, and you could cure people of cancer.“ (J.A. Moscow in Reynolds, 1998).

So wurden unterschiedliche Überwindungsstrategien entwickelt, die vorwiegend auf die Inhibition der Transportfunktion des P-Glykoproteins gerichtet waren. Es wurden Moleküle identifiziert, die die Aktivität des Substrattransports dadurch blocken, da sie selbst ebenfalls Substrate für diesen gerichteten Transport darstellen und mit den toxischen Substraten kompetieren. Die Ergebnisse der Anwendung dieser Inhibitoren in klinischen Studien waren aufgrund vielfältiger Faktoren jedoch enttäuschend: z.B. aufgrund unterschiedlicher basaler und induzierter MDR1-Expressionen in Geweben/Tumoren, wegen variierender Korrelationen von MDR1-Expression und klinischer Response nach Chemotherapie, aufgrund nicht-standardisierter

Nachweismethoden, und insbesondere wegen der partiellen Unwirksamkeit der Modulatoren zur Überwindung der MDR aufgrund nicht erreichter erforderlicher Konzentrationen im Patienten bzw. am Tumor (Bates, 1999). Darüber hinaus gibt es jedoch weitere wesentliche Gründe für diese heterogenen Daten: die Existenz weiterer, für die Generierung/Verstärkung des MDR-Phänotyps kausaler ABC-Transporter. Deshalb führten nachfolgende Entwicklungen zur Identifizierung von Molekülen, die spezifisch einen ABC-Transporter blockieren, während andere in der Lage sind, einen negativen Effekt auf die Transportaktivitäten zweier oder mehrerer ABC-Transporter auszuüben.

1.2.2 Das Multidrug Resistance-associated Protein - MRP1

Zur ABCC-Subfamilie der ABC-Transporter zählen 12 Mitglieder, deren prominentester Vertreter das 1992 in einer nicht-P-Glykoprotein-exprimierenden, aber multidrug resistenten humanen Lungenkarzinom-Zelllinie entdeckte MRP1 (ABCC1)-Gen ist (Cole et al., 1992). MRP1 ist strukturell dem P-Glykoprotein ähnlich, weist aber zusätzlich die aminoternale Extension des Protein mit 5 transmembranen Regionen auf (Abb. 2). Obwohl die Aminosäurehomologie zum P-Glykoprotein nur 15% beträgt, ist das Zytostatika-Spektrum des MRP1 dem des P-Glykoprotein sehr ähnlich, jedoch nicht identisch, und schließt Substrate wie Doxorubicin, Vincristin, Etoposid und Methotrexat ein. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch im Mechanismus des Drug-Transports: MRP1, wie auch MRP2 (ABCC2) und MRP3 (ABCC3), erkennt neutrale und anionische hydrophobe Substrate und transportiert sie bevorzugt nach Konjugation an organische Anionen wie Glutathion; oder wie für Vincristin, ko-transportiert unkonjugiertes Glutathion (Loe et al., 1998; Borst et al., 2000; Gottesman, 2002b).

Die kausale Rolle von MRP1 für die Ausprägung des MDR-Phänotyps wurde unter Verwendung definierter in vitro- und in vivo-Modelle gezeigt; dabei wurde offenbar, dass selbst geringe MRP1-Expressionsniveaus die Sensitivität gegenüber Zytostatika entscheidend modulieren (Wijnholds et al., 1997; Allen et al., 2000). Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung dieses ABC-Transporters, da in nahezu allen untersuchten malignen Geweben basale Expressionen von MRP1 nachgewiesen wurden (Nooter et al., 1995).

Für eine Reihe von Tumorentitäten wurden hohe MRP1-Expressionsniveaus im Kontext mit dem Ansprechen auf Chemotherapie beschrieben; insbesondere für Mamma-, Lungen-, und Ovarialkarzinome, aber auch für Leukämien wurden wiederholt Korrelationen der MRP1-Expression mit Parametern des „clinical outcome“, z.B. dem

krankheitsfreien Überleben publiziert (Nooter et al., 1997; Young et al., 1999; Gottesman, 2002b).

1.2.3 Das Breast Cancer Resistance Protein - BCRP

1998 wurde das Breast Cancer Resistance Protein BCRP (Mitoxantrone Resistance Associated Transporter MXR; ABC Transporter in Placenta ABCP) etwa zeitgleich in 3 Gruppen in einer Mitoxantron-resistenten, aber weder P-Glykoprotein-, noch MRP1-exprimierenden humanen Mammakarzinom-Zelllinie identifiziert (Allikmets et al., 1998; Doyle et al., 1998; Miyake et al., 1999). Dieses Gen kodiert zwar ebenfalls für einen ABC-Transporter, weist jedoch im Unterschied zu den bisher vorgestellten Vertretern der “full-transporter” lediglich 6 transmembrane Regionen und nur eine Nukleotid-Bindungsstelle auf und wird daher als „half-transporter“ bezeichnet (Abb. 2). Da durch die Transfektion des BCRP-Gens der MDR-Phänotyp erzeugt werden kann, wird angenommen, dass zur aktiven Transportfunktion die Ausbildung eines Dimers erforderlich ist (Doyle et al., 1998). Zusammen mit weiteren 5 „half-transporters“ bildet es die ABCG-Subfamilie der ABC-Transporter.

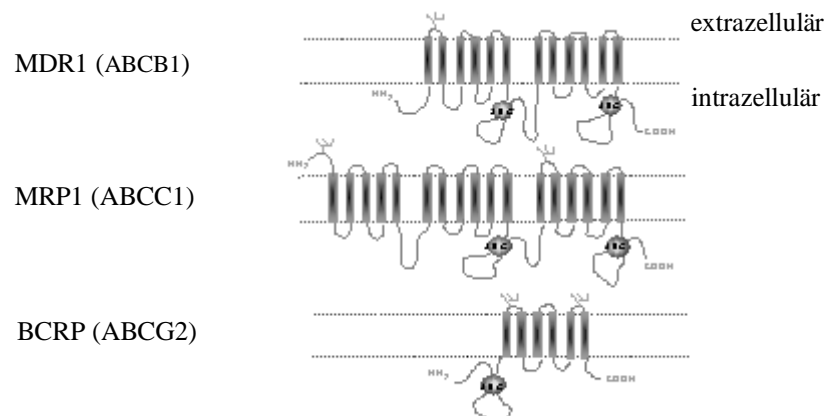


Abb. 2.

Membrantopologie der MDR-assoziierten ABC-Transporter MDR1, MRP1 und BCRP

Abbildung mit freundlicher Genehmigung von B. Sarkadi, Universität Budapest, Ungarn

Hohe BCRP-Expressionen wurden vor allem in verschiedenen Mitoxantron-selektionierten Mamma-, Kolon-, und Ovarialkarzinom-Zelllinien nachgewiesen (Ross et al., 1999; Maliepaard et al., 1999; Allen et al., 1999; Litman et al., 2000). BCRP stellt damit den lange gesuchten Transporter dar, der Mitoxantron mit einer hohen Substratspezifität transportiert; diese Substratspezifität kann allerdings durch eine

Punktmutation, die zum Aminosäureaustausch von Glycin oder Threonin zum Arginin führt, verloren gehen (Honjo et al., 2001; Allen et al., 2002).

In humanen Geweben wurde BCRP vor allem in Placenta, Darm, Mamma und Leber nachgewiesen (Litman et al., 2001; Gottesman et al., 2002a; Borst et al., 2002). In humanen Tumoren unterschiedlicher Entitäten wurden häufig intrinsische BCRP-Expressionen beobachtet; hohe BCRP-Niveaus wurden insbesondere in Karzinomen des Gastrointestinaltraktes, in Lungenkarzinomen und Melanomen beobachtet (Diestra et al., 2002). Die biologische Bedeutung einer hohen bzw. induzierten BCRP-Expression im Kontext klinischer Parameter wie Ansprechen auf Chemotherapie oder Überleben bleibt zu untersuchen.

1.3 Das Major Vault Protein MVP als Multidrug Resistenz-assoziiertes Gen

Vaults sind die größten bekannten Ribonukleoprotein-Komplexe und sind in der Evolution hoch konserviert (Abb. 3). Sie bestehen aus einer untranslatierten RNA und aus drei Proteinen: dem humanen Major Vault Protein (MVP) sowie zwei kleinen Minor Vault Proteinen p193, und p240 (Kong et al., 1999; Scheffer et al., 2000). Das MVP ist identisch mit dem MDR-assoziierten Lung Resistance Protein (LRP), das aus einer nicht-P-Glykoprotein-exprimierenden, multidrug resistenten humanen Lungenkarzinom-Zelllinie isoliert wurde (Scheper et al., 1993; Scheffer et al., 1995).

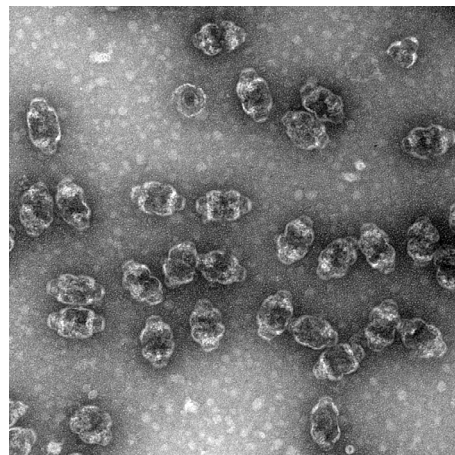


Abb. 3
Elektronenmikroskopische Aufnahme
von Vaults.
Abbildung mit freundlicher Genehmigung
von L. H. Rome, University of California,
Los Angeles, CA, USA

Die Distribution von MVP entspricht der anderer Chemoresistenz-assoziiierter Proteine mit hohen Expressionen in Geweben, die chronisch Xenobiotika-exponiert sind. (Izquierdo et al., 1996b). MVP-Expressionen wurden auch in einer Vielzahl humaner

Tumore nachgewiesen; prediktive Korrelationen mit der Chemotherapie-Response wurden wiederholt z.B. für akute myeloische Leukämie, akute lymphatische Leukämie, das multiples Myelom, das Ovarialkarzinom, und das Mammakarzinom beschrieben (Scheffer et al., 2000). Für häufig Chemotherapie-resistente Tumoren wie z.B. für Kolonkarziome wurden wiederholt erhöhte MVP-Expressionen beobachtet (Izquierdo et al., 1996b; Pohl et al., 2001), und Induktionen der MVP-Expression als frühe Ereignisse während der kolorektalen Kanzerogenese beschrieben (Meijer et al., 1999).

Erhöhte MVP-Expressionslevel wurden ebenfalls in intrinsisch multidrug resistenten Tumorzelllinien (Izquierdo et al., 1996c; Laurencot et al., 1997; Kickhoefer et al., 1998; Kitazano et al., 1999), als auch in Zytostatika-selektierten Sublinien nachgewiesen. Das Panel von Zytostatika, das zur Selektion MVP-überexprimierender, resistenter Sublinien eingesetzt wurde, beinhaltet z.B. Doxorubicin, Mitoxantron, Vincristin, Etoposid, und Cisplatin (e.g. Versantvoort et al., 1995; Komarov et al., 1998; Cheng et al., 2000; Berger et al., 2000; Hu et al., 2002; Meschini et al., 2002). Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung der Vaults als Organellen, die in den nukleozytoplasmatischen Substrattransport, vor allem hinsichtlich der Abwehr von Xenobiotika, involviert sind. (Dalton et al., 1999).

2. Fragestellung

Der Chemoresistenzmechanismus der MDR stellt in malignen Zellen ein wesentliches Hindernis für den Erfolg einer Tumor-Chemotherapie dar. Grundlegende Voraussetzungen für wirksame, Patienten-individuelle Überwindungsstrategien sind jedoch umfangreiche Kenntnisse über die Existenz MDR-relevanter Gene, deren Resistenzmechanismen und Zytostatika-Spektren, sowie deren Expressionsprofil im Patienten. Von besonderer Bedeutung für den Erfolg einer multimodalen Krebstherapie ist es jedoch, den Einfluss Krebstherapie-assoziiierter Faktoren wie Chemotherapie, Immuntherapie, und/oder Hyperthermie auf die Expressionsregulation MDR-relevanter Gene und auf den MDR-Phänotyp zu bestimmen, und deren Anteil im Kontext überlappender Resistenzmechanismen zu beurteilen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht daher in der Analyse der Expression und Regulation der prominentesten Vertreter der MDR-relevanten Gene alternativer Multidrug Resistenz-Mechanismen in Tumorzellen - MDR1, MRP1, BCRP und MVP - unter dem Einfluss Krebstherapie-assoziiierter Faktoren. Es werden Daten vorgestellt, die sowohl der klinischen Situation entsprechen, als auch Ergebnisse, generiert in experimentellen in vitro und in vivo-Modellen, die über den deskriptiven Ansatz hinaus Kenntnisse über Signaltransduktionswege und Interventionsmöglichkeiten gestatten.

Folgende, hauptsächliche Fragenkomplexe wurden adressiert:

- i. Welche Zytostatika regulieren die Expression welcher MDR-assoziierten Gene?
Können MDR-Gene durch Zytokine in ihrer Expression beeinflusst werden?
Wie ist der MDR-Phänotyp durch Zytostatika- bzw. Zytokin-Applikation moduliert? Können Erkenntnisse zur Expression und zur Stressfaktor-induzierten Regulation von MDR-Genen für MDR-Überwindungsstrategien genutzt werden?
- ii. Werden MDR-Gene Temperatur-abhängig reguliert?
Welche Transkriptionsfaktoren sind in die Hyperthermie-induzierte Regulation von MDR-Genen involviert?
Stellt der Stressfaktor Hyperthermie als Bestandteil multimodaler Therapieschemata ein Risiko zur Generierung bzw. Verstärkung einer MDR dar?
- iii. Können definierte Sequenzbereiche in MDR-Genpromotoren für Zytostatika- bzw. Hyperthermie-induzierte Expressionsregulationen identifiziert werden?
Können diese Therapie-regulierbaren MDR-Genpromotorsequenzen für Gentherapieansätze bei der Behandlung maligner Erkrankungen genutzt werden?

3. Literatur

Abolhoda, A., Wilson, A.E., Ross, H., Danenberg, P.V., Burt, M., Scotto, K.W. Rapid activation of MDR1 expression in human metastatic sarcoma following in vivo exposure to doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 5:3352-3356, 1999.

Allen, D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., Schinkel, A.H. The mouse Bcrp/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* 59:4237-4241, 1999.

Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., van Deemter, L., Wijnholds, J., Schinkel, A.H. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Res.* 60:5761-5766, 2000.

Allen, J.D., Jackson, S.C., Schinkel, A.H. A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance. *Cancer Res.* 62:2294-2299, 2002.

Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., Dean, M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58:5337-5339, 1998.

Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:361-398, 1999.

Baldini, N., Scotlandi, K., Barbanti-Brodano, G., Manara, M.C., Maurici, D., Bacci, G., Bertoni, F., Picci, P., Sottili, S., Campanacci, M., et al. Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *New Engl. J. Med.* 333:1380-1385, 1995.

Bates, S.E. Drug resistance: still on the learning curve. *Clin. Cancer Res.* 5:3346-3348, 1999.

Berger, W., Elbling, L., Micksche, M. Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int. J. Cancer* 88:293-300, 2000.

Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92:1295-1302, 2000.

Borst, P., Oude Elferink, R. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71:537-592, 2002.

Chan, H.S., Thorner, P.S., Haddad, G., Ling, V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin. Oncol.* 4:689-704, 1990.

Chaudhary, P.M., Roninson, I.B. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* 85:632-636, 1993.

Cheng, S.H., Lam, W., Lee, A.S.K., Fung, K.P., Wu, R.S.S., Fong, W.F. Low-level doxorubicin resistance in benzo[a]pyrene-treated KB-3-1 cells is associated with increased LRP expression and altered subcellular drug distribution. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64:134-142, 2000.

Chin, K.V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., Gottesman, M.M. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 265:221-226, 1990.

Cole, S.P.C., Deeley, R.G. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter MRP. *BioEssays* 20:931-940, 1998.

Dalton, W.S., Scheper, R.J. Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:1604-1605, 1999.

Dean, M., Rzhetsky, A., Alleikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11:1156-1166, 2001.

Diestra, J.E., Scheffer, G.L., Catala, I.I., Maliepaard, M., Schellens, J.H., Scheper, R.J., Germa-Lluch, J.R., Izquierdo, M.A. Frequent expression of the multi-drug resistance associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumors detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J. Pathol.* 198:213-219, 2002.

Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15665-15670, 1998.

Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M., Pastan, I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:265-269, 1987.

Goldstein, L.J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S.L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., Brodeur, G.M., et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:116-124, 1989.

Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Rev.* 2:48-58, 2002a.

Gottesman, M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* 53:615-627, 2002b.

Honjo, Y., Hrycyna, C.A., Yan, Q.W., Medina-Perez, W.Y., Robey, R.W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., Bates, S.E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* 61:6635-6639, 2001.

Hrycyna, C.A. Molecular genetic analysis and biochemical characterization of mammalian P-glycoproteins involved in multidrug resistance. *Sem. Cell Dev. Biol.* 12:247-256, 2001.

- Hu, Y., Stephen, A.G., Cao, J., Tanzer, L.R., Slapak, C.A., Harrison, S.D., Devanarayan, V., Dantzig, A.H., Starling, J.J., Rome, L.H., et al. A very early induction of major vault protein accompanied by increased drug resistance in U-937 cells. *Int. J. Cancer* 97:149-156, 2002.
- Izquierdo, M.A., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Giaccone, G., Broxterman, H.J., Meijer, C.J., van der Valk, P., Scheper, R.J. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am. J. Pathol.* 148:877-887, 1996a.
- Izquierdo, M.A., Shoemaker, R.H., Flens, M.J., Scheffer, G.L., Wu, L., Prather, T.R., Scheper, R.J. Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer-cell lines. *Int. J. Cancer* 65:230-237, 1996b.
- Juliano, R.L., Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta* 455:152-162, 1976.
- Kickhoefer, V.A., Rajavel, K.S., Scheffer, G.L., Dalton, W.S., Scheper, R.J., Rome, L.H. Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 273:8971-8974, 1998.
- Kioka, N., Yamano, Y., Komano, T., Ueda, K. Heat shock-responsive elements in the induction of the multidrug resistance gene (MDR1). *FEBS Lett.* 301:37-40, 1992.
- Kitazono, M., Sumizawa, T., Takebayashi, Y., Chen, Z.S., Furukawa, T., Nagayama, S., Tani, A., Takao, S., Aikou, T., Akiyama, S. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:1647-1653, 1999.
- Kohno, K., Sato, S.A., Takano, H., Matsua, K., Kuwano, M. The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer drugs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165:1415-1421, 1989.
- Komarov, P.G., Shtil, A.A., Holian, O., Tee, L., Buckingham, L., Mechetner, E.B., Roninson, I.B., Coon, J.S. Activation of the LRP (lung resistance-related protein) gene by short-term exposure of human leukemia cells to phorbol ester and cytarabine. *Oncol. Res.* 10:185-192, 1998.
- Kong, L.B., Siva, A.C., Rome, L.H., Stewart, P.L. Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. *Structure Fold Des.* 7:371-379, 1999.
- Labialle, S., Gayet, L., Marthinet, E., Rigal, D., Baggetto, L.G. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem. Pharmacol.* 64:943-948, 2002.
- Laurencot C.M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Shoemaker, R.H. Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines. *Int. J. Cancer* 72:1021-1026, 1997.

Leith, C.P., Kopecky, K.J., Chen, I.M., Eijdens, L., Slovak, M.L., McConnell, T.S., Head, D.R., Weick, J., Grever, M.R., Appelbaum, F.R., et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 94:1086-1099, 1999.

Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D.D., Miyake, K., Resau, J.H., Bates, S.E. The multidrug resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell Sci.* 113:2011-2021, 2000.

Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:931-959, 2001.

Loe, D.W., Deeley, R.G., Cole, S.P. Characterization of vincristin transport by the (M)R 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* 58:5130-5136, 1998.

Maliepaard, M., van Gastelen, M.A., de Jong, L.A., Pluim, D., van Waardenburg, R.C., Ruevekamp-Helmers, M.C., Floom, B.G., Schellens, J.H. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res.* 59:4559-4563, 1999.

Meijer, G.A., Schroeijers, A.B., Flens, M.J., Meuwissen, S.G., van der Valk, P., Baak, J.P., Scheper, R.J. Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* 52:450-454, 1999.

Meschini, S., Marra, M., Calcabrini, A., Monti, E., Gariboldi, M., Dolfini, E., Arancia, G. Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicol. In Vitro.* 16:389-398, 2002.

Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 59:8-13, 1999.

Nooter, K., Westerman, A.M., Flens, M.J., Zaman, G.J., Scheper, R.J., van Wingerden, K.E., Burger, H., Oostrum, R., Boersma, T., Sonneveld, P., et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers. *Clin. Cancer Res.* 1:1301-1310, 1995.

Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M.P., van Wingerden, K.E., Henzen-Logmans, S.C., Scheper, R.J., Flens, M.J., Klijn, J.G., Stoter, G., Foekens, J.A. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* 76:486-493, 1997.

Pohl, G., Suchomel, R.W., Stranzl, T., Depisch, D., Stiglbauer, W., Filipits, M., Pirker, R. Expression of the lung resistance protein in primary colorectal carcinomas. *Anticancer Res.* 21:201-204, 2001.

Reynolds, T. Research on drug resistance unearths many molecules, many mechanisms. *J. Natl. Cancer Inst.* 20:1120-1122, 1998.

Riordan, J.R., Ling, V. Purification of P-glycoprotein from the plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.* 254:12701-12705, 1979.

Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P., Doyle, L.A. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:429-433, 1999.

Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J., Clevers, H.C., Scheper, R.J. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat. Med.* 1:578-582, 1995.

Scheffer, G.L., Schroeijers, A.B., Izquierdo, M.A., Wiemer E.A., Scheper, R.J. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 12:550-556, 2000.

Scheper, R.J., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L., Kaaijk, P., Dalton, W.S., van Heijningen, T.H., van Kalken, C.K., Slovak, M.L., de Vries, E.G., van der Valk, P., et al. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* 53:1475-1479, 1993.

Scotto, K.W., Egan, D.A. Transcriptional regulation of MDR genes. *Cytotechnol.* 27:257-269, 1998.

Trock, B.J., Leonessa, F., Clarke, R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J. Natl. Cancer Inst.* 89:917-931, 1997.

Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., Pastan, I. Expression of a full-length cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3004-3008, 1987.

Versantvoort, C.H., Withoff, S., Broxtermann, H.J., Kuiper, C.M., Scheper, R.J., Mulder, N.H., de Vries, E.G. Resistance-associated factors in human small-cell lung-carcinoma GLC4 sub-lines with increasing adriamycin resistance. *Int. J. Cancer* 61:375-380, 1995.

Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M.R., Mol, C.A., Zaman, G.J., Mayer, U., Beijnen, J.H., van der Valk, M., Krimpenfort, P., Borst, P. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat. Med.* 3:1275-1279, 1997.

Young, L.C., Campling, B.G., Voskoglou-Nomikos, T., Cole, S.P., Deeley, R.G., Gerlach, J.H. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin. Cancer Res.* 3: 673-680, 1999.

TEIL II

ZYTOSTATIKA- UND ZYTOKIN- REGULIERTE EXPRESSION MDR-ASSOZIIERTER GENE

Kapitel 2

MDR1 gene expression:
evaluation of its use as a molecular marker for
prognosis and chemotherapy of bone and
soft tissue sarcomas

Stein, U., Shoemaker, R. H., Schlag, P. M.

Eur. J. Cancer 32A: 86-92, 1996

Kapitel 3

Development and characterisation of novel
human multidrug resistant mammary carcinoma
lines in vitro and in vivo

Stein, U., Walther, W., Lemm, M., Naundorf, H., Fichtner, I.

Int. J. Cancer 72: 885-891, 1997

Kapitel 4

Modulation of mdr1 expression by cytokines in
human colon carcinoma cells: an approach for
reversal of multidrug resistance

Stein, U., Walther, W, Shoemaker, R.H.

Br. J. Cancer 74: 1384-1391, 1996

Kapitel 5

Reversal of multidrug resistance by transduction
of cytokine genes into human
colon carcinoma cells

Stein, U., Walther, W., Shoemaker, R. H.

J. Natl. Cancer Inst. 88: 1383-1392, 1996

Kapitel 6

Tumor necrosis factor- α and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP

Stein, U., Walther, W., Laurencot C.M., Scheffer G.L.,
Scheper R.J., Shoemaker, R.H.

J. Natl. Cancer Inst. 89: 807-813, 1997

Kapitel 7

IL-2 gene transfer for chemosensitization of
multidrug-resistant human colon carcinoma cells

Stein, U., Walther, W., Shoemaker, R.H., Schlag, P.M.

Adv. Exp. Med. Biol. 451: 145-149, 1998

Kapitel 8

Cytokine-mediated reversal of multidrug resistance

Stein, U., Walther, W.

Cytotechnol. 27: 271-282, 1998

Kapitel 9

Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2

Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G.L., Lage, H.

Cancer Gene Ther. 9: 579-586, 2002

TEIL III

HYPERTHERMIE-REGULIERTE EXPRESSION MDR-ASSOZIIERTER GENE

Kapitel 10

Hyperthermia-induced nuclear translocation of
transcription factor YB-1 leads to enhanced
expression of multidrug resistance-related
ABC transporters

Stein, U., Jürchott, K., Walther, W., Bergmann, S.,
Schlag, P.M., Royer, H.-D.

J. Biol. Chem. 276: 28562-28569, 2001

Kapitel 11

Impact of BCRP/MXR, MRP1 and MDR1/
P-glycoprotein on thermoresistant variants of
atypical and classical multidrug resistant
cancer cells

Stein, U., Lage, H., Jordan, A., Walther, W., Bates, S.E.,
Litman, T., Hohenberger, P., Dietel, M.

Int. J. Cancer 97: 751-760, 2002

Kapitel 12

Hyperthermia for treatment of rectal cancer:
evaluation for induction of multidrug resistance
gene (mdr1) expression

Stein, U., Rau, B., Wust, P., Walther, W., Schlag, P.M.

Int. J. Cancer 80: 5-12, 1999

Kapitel 13

Expression of multidrug resistance genes MVP,
MDR1, and MRP1 determined sequentially
before, during, and after hyperthermic isolated
limb perfusion of soft tissue sarcoma and
melanoma patients

Stein, U., Jürchott, K., Schläfke, M., Hohenberger, P.

J. Clin. Oncol., 20: 3282-3292, 2002

TEIL IV

ANALYSE MDR-ASSOZIIERTER GENPROMOTOREN UND DEREN THERAPIE-INDUZIERTER REGULATION

Kapitel 14

Point mutations in the *mdr1* promoter of human
osteosarcomas are associated with in vitro
responsiveness to multidrug resistance
relevant drugs

Stein, U., Walther, W., Wunderlich, V.

Eur. J. Cancer 30A: 1541-1545, 1994

Kapitel 15

Vincristine induction of mutant and wild-type
human multidrug-resistance promoters is
cell-type-specific and dose-dependent

Stein, U., Walther, W., Shoemaker, R.H.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 275-282, 1996

Kapitel 16

Employment of the *mdr1* promoter for the
chemotherapy-inducible expression of
therapeutic genes in cancer gene therapy

Walther, W., Wendt, J., Stein, U.

Gene Ther. 4: 544-552,1997

Kapitel 17

mdr1 promoter-driven tumor necrosis factor- α
expression for a chemotherapy-controllable
combined in vivo gene therapy and
chemotherapy of tumors

Walther, W., Stein, U., Fichtner, I., Alexander, M.,
Shoemaker, R.H., Schlag, P.M.

Cancer Gene Ther. 7: 893-900, 2000

Kapitel 18

Use of the human MDR1 promoter for
heat-inducible expression of therapeutic genes

Walther, W., Stein, U., Schlag, P.M.

Int. J. Cancer 98: 291-296, 2002

Kapitel 19

Cloning and initial analysis of the human multidrug resistance-related MVP/LRP gene promoter

Lange, C., Walther, W., Schwabe, H., Stein, U.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 278: 125-133, 2000

Kapitel 20

YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-
inducible expression of major vault protein
(MVP) gene

Stein, U., Bergmann, S., Scheper, R.J., Royer, H.-D.,
Schlag, P.M., Walther, W.

eingereicht, 2002

TEIL V
Kapitel 21

**ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE,
DISKUSSION UND WERTUNG**

1. Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

1.1 Zytostatika- und Zytokin-regulierte Expression

MDR-assoziierter Gene

Der Resistenzmechanismus der MDR ist gekennzeichnet durch die simultane Resistenz von Tumorzellen gegenüber strukturell und funktionell nicht-verwandten zytotoxischen Verbindungen; er wird durch die Expression MDR-assoziierter Gene verursacht, resultierend in reduzierten Akkumulationen von MDR-assozierten Zytostatika. Externe Stressfaktoren als Komponenten multimodaler Behandlungsschemata, wie z.B. ein breites Spektrum von Zytostatika mit unterschiedlichem Wirkmechanismus, können die Expression dieser MDR-Gene induzieren und/oder verstärken. Daher kann der Erfolg einer Chemotherapie sowohl von der intrinsischen als auch von der durch Zytostatika-Applikation erworbenen, induzierten MDR des Patienten abhängig sein. Zur Effizienzsteigerung der Patienten-individuellen Response ist es daher wünschenswert, den Expressionsstatus sowie die Regulation MDR-assoziierter Gene zu kennen, um basierend auf dieser Rationale Auswahl und Applikationszeitpunkt der Zytostatika an die individuelle Situation anzupassen.

Deshalb wurden in den folgenden Arbeiten die Fragen adressiert, ob die MDR1-Expression als molekularer Marker für Prognose und Chemotherapie genutzt werden kann, ob/welche Zytostatika die Expression MDR-assoziierter Gene wie MDR1, MRP1, BCRP und MVP induzieren, und ob/welche Zytokine die Expression der MDR-Gene beeinflussen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden darüber hinaus Strategien zur Überwindung der MDR evaluiert; so z.B. mittels der externen Applikation von Zytokinen bzw. der durch Zytokin-Gentransfer, oder mit Hilfe der Ribozym-Technologie.

Kapitel 2

In dieser Arbeit wurden eigene Daten im Kontext der Literatur unter dem Aspekt evaluiert, ob sich die MDR1-Genexpression als alleiniger, wenn auch prominentester molekularer Marker für die Beurteilung von Prognose und Chemotherapie bei Knochen- und Weichgewebstumoren eignen kann (**Kapitel 2**; Stein et al., 1996). Intrinsische MDR1-Expressionen wurden bereits vor jeglicher Therapie in ca. 40% der untersuchten Tumoren mit unterschiedlichen Expressionshöhen nachgewiesen. Chemotherapie-induzierte MDR1-Expressionen wurden in der Mehrzahl der Fälle beobachtet. Signifikante Korrelationen wurden für hohe Therapie-induzierte MDR1-Expressionen

(vs. basale Expression zum Zeitpunkt der Diagnose) und einer ungünstigen Prognose beschrieben.

Es wurde die Notwendigkeit hervorgehoben, Untersuchungen zur Beurteilung von Genexpressionen im Kontext klinischer Parameter in Anlehnung an die Durchführung klinischer Studien nach standardisierten Kriterien durchzuführen: einheitliche biologische Arbeitshypothese (z.B. intrinsische vs. erworbene MDR1-Expression), definierte Tumorproben, definierte Behandlung der Patienten, definierte Untersuchungszeitpunkte, Studiendurchführung (retrospektiv vs. prospektiv), Einsatz einheitlicher Methoden und Verifikationskriterien. Darüber hinaus ist die Korrelation eines einzigen molekularen Markers mit Parametern des „clinical outcome“ jedoch problematisch, insbesondere dann, wenn es sich um ein multifaktorielles Problem wie MDR handelt. Die Analyse weiterer MDR-Gene wie z.B. MRP1 und MVP ist daher erforderlich. Darauf wird in einer weiteren Arbeit (**Kapitel 13**, Stein et al., 2002) näher eingegangen.

Kapitel 3

Adriamycin, ein in der Tumorthherapie oft eingesetztes Zytostatikum, zählt zu den klassischen, einen MDR-Phänotyp verursachenden Zytostatika. Da der MDR-Phänotyp das Resultat unterschiedlicher MDR-assoziierter Gene repräsentiert, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Adriamycin auf die Genexpression von MDR1, und darüber hinaus auf MRP1 und MVP untersucht. Es wurden dafür drei Mammakarzinom-Zelllinien, MT-1, MT-3 und MaTu mit steigenden Konzentrationen von Adriamycin behandelt, selektioniert und die neuen resistenten Linien MT-1/ADR, MT-3/ADR, MaTu/ADR generiert (**Kapitel 3**; Stein et al., 1997); anhand des bekannten Modells MCF-7 und MCF-7/ADR erfolgte die Verifikation der Ergebnisse.

Die Sublinien zeigten in vitro neben der Adriamycin-Resistenz als Folge der Selektion auch eine Kreuzresistenz zu Vincristin. Im in vivo-Modell wurden die Resistenzen gegen Adriamycin und Vincristin anhand fehlender Tumorwachstumsinhibitionen bestätigt. Genexpressionsanalysen ergaben gesteigerte MDR1-Niveaus auf beiden Expressionsebenen in allen drei neu generierten multidrug resistenten Sublinien MT-1/ADR, MT-3/ADR und MaTu/ADR im Vergleich zur jeweiligen parentalen Linie, während MRP1- und MVP-Expressionen nicht signifikant moduliert waren. In Drug-Akkumulations-Assays wurde die erhöhte Pumpaktivität und damit die Funktionalität des induzierten ABC-Transporters P-Glykoprotein nachgewiesen. Damit wurde die Adriamycin-induzierte MDR1-Überexpression als

kausaler Faktor für den generierten MDR-Phänotyp in diesen drei multidrug resistenten Mammakarzinom-Zelllinien identifiziert. Es wurden somit drei neue, hinsichtlich ihrer MDR-Charakteristika definierte in vitro- Modelle etabliert.

Kapitel 4

Vielfältige Ansätze wurden in humanen Tumorzellen erprobt, um den MDR-Phänotyp zu überwinden oder zumindest partiell eine Chemosensitivierung zu erreichen. Zumeist zielten diese Ansätze auf eine Interaktion mit dem Genprodukt P-Glykoprotein ab (z.B. Kalziumkanal-Blocker, Antikörper). Obwohl die experimentellen Daten oft sehr vielversprechend aussahen, war die Effizienz in klinischen Studien aufgrund nicht/schwer erreichbarer Inhibitor-Konzentrationen am Tumor limitiert. Da hohe intrinsische bzw. induzierte, erworbene MDR1-Expressionsniveaus zum ungünstigen MDR-Phänotyp führen, ist die Entwicklung alternativer Überwindungsstrategien der MDR, basierend auf MDR1-Expressionsinterventionen, von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der wiederholten Beobachtung, dass die Gabe von Zytokinen zur Chemosensitivierung von Tumorzellen führen kann, wurde in den folgenden Arbeiten der Frage nachgegangen, ob diese Chemosensitivierung als Überwindungsstrategie eines MDR-Phänotyps auf einer Zytokin-vermittelten Expressionsmodulation MDR-assoziierter Gene basieren kann.

Es wurde daher das Potential humaner Zytokine, z.B. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin-2 (IL-2), untersucht, die Expression des MDR1-Gens in zwei Kolonkarzinomlinien mit unterschiedlichem intrinsischen MDR-Status (HCT15, HCT116) zu modulieren (**Kapitel 4**; Stein et al., 1996). Interessanterweise wurde gefunden, dass die MDR1-Expression auf beiden Expressionsebenen durch die Gabe von Zytokinen zeitabhängig vermindert wurde. Funktionelle Akkumulationsassays sowie erhöhte Chemosensitivitäten gegenüber Adriamycin und Vincristin bestätigten diese Daten. Diese Ergebnisse zeigten, dass die externe Gabe von Zytokinen den MDR-Phänotyp auf der Basis der Expressionsmodulation des MDR1-Gens revertieren kann. Mit fortführenden Arbeiten wurde diese alternative MDR-Überwindungsstrategie weiter evaluiert (**Kapitel 5-7**).

Kapitel 5

TNF α und IL-2 sind Zytokine, die extensiv in vitro, in vivo und in klinischen Studien zur Immuntherapie von malignen Erkrankungen getestet wurden. Ihr Einsatz zur Chemosensitivierung resistenter Tumoren erscheint deshalb besonders attraktiv. Jedoch kann ihre systemische Applikation zu schweren Nebenwirkungen führen. Basierend auf

den Ergebnissen zur MDR-Überwindung nach externer Zytokin-Applikation wurde daher die Frage gestellt, ob die Transfektion dieser Zytokin-Gene ebenfalls zu modulierten, reduzierten MDR1-Expressionsniveaus, und basierend darauf, zur Chemosensitivierung multidrug resistenter Tumorzellen führen kann (**Kapitel 5**; Stein et al., 1996). Zur Vergleichbarkeit der Zytokin-vermittelten Effekte nach externer Gabe und nach Zytokinen-Transfektion wurden ebenfalls die humanen Kolonkarzinomzellen HCT15 und HCT116 eingesetzt.

Es wurde gezeigt, dass auch durch die Transfektion der Zytokine in die Tumorzellen MDR-Phänotyp revertiert werden kann. Die Expression des MDR1-Gens war sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene reduziert, und die Stärke der verminderten MDR1-Genexpression korrelierte mit der Menge des Zytokins. Die Akkumulation des MDR-assoziierten Zytostatikums Adriamycin war in stabil Zytokinen-transfizierten Tumorzellen gesteigert, korrelierend mit einer erhöhten Chemosensitivität gegenüber den Zytostatika Adriamycin und Vincristin. Diese Daten unterstreichen den potentiellen Wert der kombinierten Behandlung eines resistenten Tumors mit Zytokinen und Chemotherapie, weisen darüber hinaus aber auch auf die nützliche Inklusion der Gentherapie in Chemotherapie-Protokolle hin.

Kapitel 6

Diese Arbeit wurde mit der Zielstellung durchgeführt, den Einfluss von $\text{TNF}\alpha$, sowohl extern appliziert als auch gentransfiziert, auf die Expression weiterer MDR-assoziiierter Gene, MRP1 und MVP, zu untersuchen (**Kapitel 6**; Stein et al., 1997). Es sollte im Kontext der Zytokin-vermittelten Reversion des MDR-Phänotyps die Frage beantwortet werden, ob potentielle $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Expressionsmodulation dieser MDR-Gene zur Überwindung einer MDR beitragen können.

Es wurde nachgewiesen, dass sowohl die externe Applikation von $\text{TNF}\alpha$ als auch dessen Expression nach Gentransfer die Expression der MDR-assoziierten Gene MRP1 und MVP auf beiden Ebenen modulieren kann. Interessanterweise jedoch beeinflusste die $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung die Genaktivitäten von MRP1 und MVP in unterschiedlicher Weise: die Expression von MVP wurde nach externer Zytokin-Applikation zeitabhängig in beiden in vitro-Modellen (HCT15, HCT116) deutlich vermindert; in stabil $\text{TNF}\alpha$ -transfizierten Zellen wurden in Abhängigkeit von der Menge des Zytokins reduzierte MVP-Expressionen gefunden. Diese Resultate waren konform mit den Daten der Zytokin-regulierten MDR1-Expression. Im Gegensatz dazu wurden nach externer $\text{TNF}\alpha$ -Gabe in HCT116-Zellen erhöhte, und in HCT15-Zellen unveränderte MRP1-Niveaus

gemessen; TNF α -Transfektion resultierte in beiden in vitro-Modellen in gesteigerten MRP1-Expressionen. Diese Ergebnisse zeigen einerseits die Diversität der TNF α -verursachten Effekte im Kontext der Regulation MDR-assoziierter Gene. Im Hinblick auf die bereits diskutierten, Zytokin-vermittelten gesteigerten Zytostatika-Akkumulationen und Chemosensitivierungen wurde darüber hinaus deutlich, dass für Interventionsstrategien mit dem Ziel der Reversion des MDR-Phänotyps die Kenntnis der Beteiligung definierter MDR-Gene unumgänglich ist.

Kapitel 7

Aufgrund der überraschenden Effekte von TNF α auf die Expressionsregulation unterschiedlicher MDR-assoziierter Gene und deren Beteiligung an der Ausprägung bzw. Reversion des MDR-Phänotyps wurde in der folgenden Arbeit der Frage nachgegangen, welche der MDR-Gene, MRP1, MVP und MDR1, durch die endogene Expression des Zytokins IL-2 moduliert werden können (**Kapitel 7**; Stein et al., 1998).

Gentransfer von IL-2 (wiederum Analyse mehrerer separat selektionierter Zellklone) führte ebenfalls zu Chemosensitivierungen gegenüber den Zytostatika Adriamycin und Vincristin in beiden in vitro-Modellen. Die Expressionen der Gene MRP1 und MVP allerdings waren in den stabil IL-2-transfizierten Zellen nicht signifikant moduliert, wohingegen die Expression von MDR1 erneut deutlich vermindert war. Damit wurde im Gegensatz zu den Befunden der TNF α -vermittelten Reversion des MDR-Phänotyps (**Kapitel 6**) ausschließlich die Expression eines hier untersuchten MDR-Gens beeinflusst. Im Ergebnis konnte so die IL-2-vermittelte Chemosensitivierung auf die Expressionsregulation des MDR1-Gens (im Vergleich mit MRP1 und MVP) zurückgeführt werden.

Kapitel 8

In dieser Arbeit wurden die bisherigen Befunde zur Zytokin-vermittelten Reversion des MDR-Phänotyps, nachgewiesen auf der Grundlage von Genexpressionsinterventionen in in vitro-Modellen, im Kontext der Literatur evaluiert (**Kapitel 8**; Stein et al., 1998).

In der überwiegenden Mehrzahl der analysierten Studien wurden ebenfalls Zytokin (einschließlich TNF α und IL-2) -vermittelte Chemosensitivierungen gegenüber MDR-assozierten Zytostatika, z.B. Adriamycin, Vincristin, Taxol, Etoposid und Actinomycin D, aber auch gegenüber nicht-MDR-assozierten Zytostatika (z.B. 5-Fluorouracil) beschrieben. Diese Zytokineffekte wurden sowohl in einem Panel von

unterschiedlicher Tumorzelllinien in vitro als auch unter Verwendung verschiedener experimenteller Tumormodelle in vivo gezeigt. Damit wurden unsere Beobachtungen hinsichtlich der Zytokin-vermittelten Reversion des Resistenz-Phänotyps bestätigt. Darüber hinaus jedoch zeigten unsere hier vorgelegten Arbeiten molekularbiologische Daten zur Beteiligung mehrerer MDR-Gene an Ausprägung und Reversion der MDR, und inkludierten mit Gentransferexperimenten die potentielle Anwendung einer kombinierten Genimmun- und Chemotherapie für maligne Erkrankungen.

Kapitel 9

Eine weitere MDR-Überwindungsstrategie, alternativ zu denen, die auf Inhibierung der Funktion von MDR-Proteinen abzielen, besteht im Einsatz von Ribozymen, die gegen mRNA-Moleküle MDR-assoziiierter Gene gerichtet sind. In der folgenden Arbeit wurde die Verwendung von Ribozymen zur Degradation der mRNA eines weiteren MDR-assoziierten ABC-Transporters, des BCRP-Gens, untersucht (**Kapitel 9**; Kowalski et al., 2002). Es wurde der Frage nachgegangen, ob durch den Einsatz BCRP-spezifischer Ribozyme der atypische MDR-Phänotyp von Tumorzellen beeinflusst werden kann.

Die Mitoxantron-resistente und BCRP-überexprimierende humane Magenkarzinom-Zelllinie EPG85-257RNOV zeigte den atypischen, nicht-P-Glykoprotein-vermittelten MDR-Phänotyp. Nach Transfektion BCRP-spezifischer Ribozyme wurden in diesen Zellen verminderte Expressionsniveaus von BCRP auf beiden Expressionsebenen, im Vergleich zu Zellen, die nicht oder mit Kontroll-Ribozymen transfiziert wurden, nachgewiesen. Damit wurde zunächst die Funktionalität der Ribozyme gezeigt. Des weiteren waren erhöhte Akkumulationen von Mitoxantron in den BCRP-Ribozym-transfizierten Zellen gemessen. Gesteigerte Chemosensitivitäten wurden gegenüber Mitoxantron, aber ebenfalls auch gegenüber Daunomycin, Cisplatin und Etoposid beobachtet. Somit wurde durch den Einsatz von Ribozymen eine kausale Rolle des ABC-Transporters BCRP für die Mitoxantron-induzierte, atypische MDR gezeigt. Darüber hinaus demonstrierten diese Ergebnisse die vielversprechende Anwendung dieser Ribozyme zur Überwindung des atypischen MDR-Phänotyps.

1.2 Hyperthermie-regulierte Expression MDR-assoziiierter Gene

Der MDR-Phänotyp eines Tumors repräsentiert ein wesentliches Kriterium für Erfolg und Effizienz einer Chemotherapie. Einige Behandlungsschemata inkludieren zur

Steigerung der Effizienz der Chemotherapie die Anwendung der Hyperthermie; so als Tiefenhyperthermie für lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome im Kontext einer Radio-Chemo-Thermo-Therapie (RCTT), oder als hypertherme isolierte Extremitätenperfusion (isolated limb perfusion, ILP) in Kombination mit TNF α und Zytostatika für Sarkome und Melanome.

Die folgenden Arbeiten wurden deshalb mit den Zielstellungen durchgeführt nachzuweisen, ob/welche MDR-assoziierten Gene durch Hyperthermie induziert werden können, ob Hyperthermie-verursachte Expressionsmodulationen von MDR-Genen temperatur- und zeitabhängig stattfinden, welche Transkriptionsfaktoren an der Hyperthermie-induzierten Expressionssteigerung von MDR-Genen beteiligt sind, und ob der MDR-Phänotyp moduliert wird. Es wurden Daten zum Einfluss von Hyperthermie und von Thermoresistenz auf die Expression, Regulation und Funktion von MDR-assoziierten Genen in in vitro-Modellen generiert, sowie die Beteiligung des Transkriptionsfaktors YB-1 an der Hyperthermie-induzierten Expression von MDR-Genen untersucht. Darüber hinaus wurde die Bedeutung der Hyperthermie als potentieller Risikofaktor zur Induktion/Verstärkung einer MDR auch in unterschiedlichen klinischen Situationen, im Kontext der RCTT beim Rektumkarzinom und der hyperthermen ILP beim Weichgewebssarkomen und Melanom evaluiert.

Kapitel 10

Der Einfluss der Hyperthermie auf die Expression, Regulation und Funktion der Gene MDR1 und MRP1 wurde in vitro an humanen Kolonkarzinom-Zelllinien (HCT116, HCT15) untersucht (**Kapitel 10**; Stein et al., 2001). So verursachte eine Hyperthermie von 43°C für 2 h die Translokation des Transkriptionsfaktors YB-1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Diese Translokation führte zur nukleären Akkumulation von YB-1 und zu einer verstärkten Bindung an entsprechende Sequenzmotive in den Genpromotoren der MDR-assoziierten Gene MDR1 und MRP1. Als Folge dessen wurden Induktionen der Expression des MDR1-Gens als auch des MRP1-Gens auf beiden Expressionsniveaus in Abhängigkeit von Temperatursteigerung, Dauer der Hyperthermie und dem intrinsischen MDR-Status beobachtet. Die Funktionalität der induzierten Proteine P-Glykoprotein und MRP1 wurde nachgewiesen und war in den hyperthermierten Zellen gesteigert. Allerdings führte die Kombination von Hyperthermie und Adriamycin zu einem reduzierten Überleben der Zellen, verglichen mit alleiniger Hyperthermie und alleiniger Zytostatika-Behandlung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Hyperthermie in diesen in vitro-Modellen zu induzierten Expressionen MDR-assoziiierter Gene und zu gesteigerten Pumpaktivitäten der ABC-Transporter P-Glykoprotein und MRP1 führt. Sie zeigen aber auch, dass Hyperthermie nicht notwendigerweise auch einen verstärkten MDR-Phänotyp verursacht. Die Beobachtung einer Hyperthermie-induzierten, gesteigerten Chemosensitivität trotz der Gegenwart erhöhter funktioneller MDR-Proteine kann eine Erklärung für die Resultate sein, die in der Klinik bei der kombinierten Behandlung von Kolonkarzinom-Patienten mit Hyperthermie und Chemotherapie erzielt werden.

Kapitel 11

Der Einfluss der Hyperthermie auf Expression und Funktion von ABC-Transportern wurde darüber hinaus auch an Langzeit-hyperthermierten, thermoresistenten Karzinom-Zelllinien untersucht (**Kapitel 11**; Stein et al., 2002). Dafür wurde ein unikales Modell der humanen Magenkarzinom-Zelllinie EPG85-257 eingesetzt, welches neben der parentalen Linie je eine Doxorubicin (klassischer MDR-Phänotyp)- und eine Mitoxantron (atypischer MDR-Phänotyp)-selektionierte, chemoresistente Sublinie, sowie thermoresistente Varianten dieser drei Linien beinhaltet.

Während in der Mitoxantron-selektierten Sublinie die Expression von BCRP und MRP1 (vs. parentaler und Doxorubicin-selektierter Sublinie) gesteigert war, wurde eine dramatisch erhöhte MDR1-Expression in der Doxorubicin-selektierten Sublinie (vs. parentaler und Mitoxantron-selektierter Sublinie) nachgewiesen. Sehr bemerkenswert war jedoch, dass in allen thermoresistenten Varianten dieser drei Sublinien (vs. korrelierende thermosensitive Sublinie) induzierte Expressionsniveaus aller drei ABC-Transporter BCRP, MRP1 und MDR1 gemessen wurden. Die Funktionalität der ABC-Transporter wurde in Akkumulationsassays unter Verwendung von Inhibitoren nachgewiesen. Dennoch wurden auch hier keine verminderten Konzentrationen der fluoreszierenden Substrate Doxorubicin, Mitoxantron und Rhodamin 123 beobachtet. Als Ergebnis dieser Untersuchungen konnte zusammengefasst werden, dass die Induktion der Expressionsniveaus von BCRP, MRP1 und MDR1 vom Zytostatikum der Zelllinien-Selektion und damit vom Chemoresistenztyp (klassischer vs. atypischer MDR-Phänotyp) abhängig ist. In den thermoresistenten Varianten allerdings wurden Hyperthermie-induzierte, gesteigerte Expressionen dieser ABC-Transporter nachgewiesen, die jedoch nicht zu einer Verstärkung des MDR-Phänotyp führten. Diese Daten, generiert mit thermoresistenten und damit Langzeit-Hyperthermie-behandelten Karzinom-Linien bestätigen somit die Ergebnisse, die mittels Kurzzeit-Hyperthermie erhalten wurden: der

Faktor der Temperaturerhöhung ist für die Regulation von MDR-assoziierten Genen von erheblicher Bedeutung; die biologische Konsequenz dieser gesteigerten, funktionell aktiven ABC-Transporter hinsichtlich eines potentiell alterierten MDR-Phänotyps sollte deshalb im klinischen Setting geprüft werden.

Kapitel 12

Der Einfluss der Hyperthermie im Kontext einer RCTT für lokal fortgeschrittene Rektumkarzinome wurde zunächst hinsichtlich einer potentiell modulierbaren Expression des MDR1-Gens an Geweben von 19 effektiv hyperthermierten (cum min $T_{90}>15\text{min}$; $40,5-42^{\circ}\text{C}$) Patienten vs. 9 nicht und 4 nicht-effektiv (cum min $T_{90}<15\text{min}$) hyperthermierten Patienten analysiert (**Kapitel 12**; Stein et al., 1999). Es wurde damit der Frage nachgegangen, ob Hyperthermie im dieser klinischen Situation einen potentiellen Risikofaktor für die Induktion/Verstärkung eines MDR-Phänotyps über die induzierte Expression des MDR1-Genes darstellen kann.

In Gewebeproben, entnommen vor RCTT und 4-6 Wochen danach, wurden in der Mehrzahl der Fälle keine modulierten MDR1-Expressionsniveaus beobachtet (10% erhöht; 16% vermindert). Diese Ergebnisse werden auf das große zeitliche Intervall zwischen Behandlung und molekularbiologischen Untersuchungszeitpunkten zurückgeführt, das zwar den klinischen Gegebenheiten entspricht, ein Monitoring potentiell modulierter Genexpressionslevel jedoch kaum gestattet. Es ist vielmehr anzunehmen, dass Expressionsänderungen, insbesondere auf mRNA-Ebene, zeitnah zur Intervention stattfinden, wie es z.B. in den in vitro-Modellen (**Kapitel 10**; Stein et al., 2001) und für andere klinische Situationen in Tumoren (**Kapitel 13**; Stein et al., 2002) gezeigt wurde. Das Überleben und das krankheitsfreie Überleben konnten durch den Einsatz effektiver Hyperthermie im Rahmen der RCTT (vs. ineffektiver Hyperthermie bzw. Radio-Chemo-Therapie allein) gesteigert werden.

Kapitel 13

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss der Hyperthermie auf die Expression der MDR-assoziierten Gene MDR1, MRP1 und MVP im Rahmen der hyperthermen ILP mit $\text{TNF}\alpha$ und Melphalan an 21 Patienten mit fortgeschrittenen Weichgewebstumoren und lokoregional metastasierten malignen Melanomen untersucht (**Kapitel 13**; Stein et al., 2002). Jede der Komponenten dieser multimodalen Behandlung – Zytostatika, Zytokine, Hitze – beinhaltet prinzipiell das Potential zur Modulation einer MDR. Es wurde hier das Risiko, einen MDR-Phänotyp zu generieren oder zu verstärken, im

klinischen Setting der hyperthermen ILP evaluiert. Es ist die erste Studie, die potentielle Expressionsmodulationen MDR-assoziierter Gene an sequentiell gewonnenen Tumorproben pro Patient, vor, während und nach der hyperthermen isolierten Extremitätenperfusion, analysiert. Um diese Therapie-bedingten Expressionsmodulationen zeitnah zu erfassen, wurden durchschnittlich 7 Tumorproben/Patient definierter Behandlungszeitpunkte untersucht.

In allen untersuchten Proben konnten basale MVP-Expressionen nachgewiesen werden; in mehr als 80% der Fälle wurde jedoch interessanterweise eine gesteigerte Expression des MVP-Gens während der hyperthermen ILP beobachtet. Diese Therapie-induzierten MVP-Expressionen verliefen in Abhängigkeit der maximal erreichten Temperatur (positive Korrelationen für MVP_{max} vs. T_{max} während ILP, sowie für MVP und Temperatur zum Untersuchungszeitpunkt der TNF α /Zytostatika-Gabe). Es wurden zwei wesentliche Typen der Patienten-individuellen Verläufe der ILP-induzierten MVP-Induktion beobachtet: die simultan zur Temperatursteigerung erhöhte MVP-Expression, sowie die in Bezug zur Temperatursteigerung zeitlich verzögerte MVP-Erhöhung. Allerdings wurde in der Mehrzahl der Tumoren keine Induktion der Expressionen von MDR1 (13%) und MRP1 (27%) gemessen. Diese Untersuchungsergebnisse werden auf die Höhe der maximal erreichten Temperatur zurückgeführt, da zwar einerseits Induktionen dieser beiden ABC-Transporter durch Temperaturerhöhung in vitro bei 43°C beobachtet wurden (**Kapitel 10**; Stein et al., 2001), diese Temperaturen bei der milden, hyperthermen ILP (<40,5°C) aber nicht erzielt werden.

1.3 Analyse MDR-assoziierter Genpromotoren und deren Therapie-induzierte Regulation

In den bisher vorgestellten Arbeiten wurde nachgewiesen, dass unterschiedliche externe Stressfaktoren wie verschiedene Zytostatika, Zytokine, aber auch Hyperthermie, die MDR-assozierten Gene MDR1, MRP1, BCRP und MVP auf der Ebene der Expression beeinflussen können. Diese Stressfaktoren sind Bestandteile von Therapieschemata maligner Erkrankungen. Es wurden nun die Fragen adressiert, ob die beobachteten Therapie-induzierten Effekte über die Genpromotoren der entsprechenden MDR-Gene wirken. Es wurden mutierte Varianten des MDR1-Promotors in humanen Tumoren beschrieben und ein bisher nicht bekannter Genpromotor, der des MVP-Gens, identifiziert und charakterisiert. Die Induzierbarkeit dieser Promotorsequenzen durch Therapie-assozierte Faktoren wurde untersucht. Des weiteren wurde in diesem Kontext die Beteiligung des Transkriptionsfaktors YB-1 geprüft. Basierend auf diesen

Erkenntnissen wurde der Frage nachgegangen, ob unter Verwendung spezifischer Sequenzen dieser Promotoren Fremdgene Therapie-induziert exprimiert werden können. Dieser gentherapeutische Ansatz wurde unter Einsatz verschiedener Induktoren, unterschiedlicher MDR-Genpromotoren bzw. Sequenzen davon, verschiedener Reportergene und therapeutisch relevanter Gene in unterschiedlichen Modellen evaluiert.

Kapitel 14

Innerhalb der heterogenen Tumorentität der Sarkome zeigen Osteosarkome häufig hohe intrinsische MDR1-Genexpressionen, während z.B. maligne fibröse Histiozytome (MFH) intrinsisch keine oder kaum detektierbare MDR1-Genexpressionsniveaus aufweisen (**Kapitel 2**; Stein et al., 1996). Das Ziel dieser Arbeit (**Kapitel 14**; Stein et al., 1994) bestand deshalb darin, definierte MDR1-Promotorsequenzen aus diesen beiden Tumorlokalisationen zu amplifizieren und deren Sequenz zu identifizieren. Es sollten die Fragen beantwortet werden, ob diese Sequenz des MDR1-Promotors in allen Tumoren identisch ist, oder ob wiederholt Mutationen auftreten, die möglicherweise mit der Tumorlokalisation (Osteosarkom vs. MFH) und dem intrinsischen Resistenzstatus korrelieren.

Überraschenderweise wurden in der Gruppe der Osteosarkome mit meist hohen intrinsischen MDR1-Expressionen in 7 der 9 untersuchten Tumoren Punktmutationen im MDR1-Promotor gefunden: an Position 103 wurde eine T→C Transition nachgewiesen (2/9), und an Position 137 eine G→T Transversion identifiziert (5/9). Interessanterweise wurde in den MDR1-Promotoren der 8 untersuchten MFH mit keinem/niedrigem intrinsischen MDR1-Niveau keine Mutationen, sondern ausschließlich die Wildtyp-Sequenz beobachtet. Die identifizierten MDR1-Promotorvarianten (Wildtyp, T→C- und G→T-mutiert) wurden hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit durch MDR-assoziierte Zytostatika im Reportergen-Assay untersucht. Es zeigte sich, dass die generell nachweisbare Induzierbarkeit der Wildtyp-Sequenz des MDR1-Promotors durch Adriamycin und Vincristin mit der des G→T-mutierten Konstrukts vergleichbar war, dass jedoch die T→C-mutierte Promotorvariante zu deutlich erhöhten Induktionsniveaus der Reporterexpression führte. In einer späteren Arbeit wurde gezeigt, dass sich diese relevante Mutation an einer Position im MDR1-Promotor befindet, die als „drug responsive element“ bezeichnet wird.

Kapitel 15

Das Ziel dieser Arbeit (**Kapitel 15**; Stein et al., 1996) bestand in der weiteren Analyse der Punkt-mutierten MDR1-Promotorvarianten. Es sollte im in vitro-Modell die Beobachtung geprüft werden, ob die unterschiedliche Zytostatika-Induzierbarkeit der Wildtyp- und der mutierten Varianten vom MDR-Phänotyp der jeweiligen Zelllinie abhängig ist. Es wurden deshalb hoch multidrug resistente (HCT15) und sensitive (KM12) Tumorzellen mit Reporter-gen-Konstrukten transfiziert, die mittels der verschiedenen MDR1-Promotorvarianten kontrolliert wurden.

Die HCT15-Zelllinie mit hohen intrinsischen MDR-Charakteristika (MDR1-Expression und Funktionalität) zeigte im Vergleich zur KM12-Linie (keine detektierbare MDR1-Expression) deutlich höhere basale als auch Vincristin-induzierte Reporter-gen-Niveaus. Wiederum wurden mit der an Position 103 T→C-mutierten Promotorvariante die höchsten basalen und induzierten Niveaus des Reportergens gemessen. Darüber hinaus wurde eine Dosis-Abhängigkeit der Vincristin-induzierten Reporter-gen-Expression in beiden Zelllinien für alle verwendeten Promotorvarianten beobachtet. Damit wurde nachgewiesen, dass mutierte MDR1-Promotorvarianten prinzipiell wie deren Wildtyp-Sequenzen funktionieren: sie sind über einen breiten Konzentrationsbereich mit Zytostatika induzierbar und ihre Aktivität korrespondiert mit dem MDR-Phänotyp der jeweiligen Zelllinie. Die T→C-mutierte MDR1-Promotorvariante zeigte jedoch auch in diesen in vitro-Modellen die höchsten Induktionsniveaus und wurde deshalb für fortführende Untersuchungen ausgewählt.

Kapitel 16

Nachdem die T→C-mutierte MDR1-Promotorvariante wiederholt zu den höchsten Zytostatika-induzierten Reporter-gen-Expressionen führte, sollte diese Arbeit die Frage beantworten, ob die Expression eines therapeutisch interessanten Gens wie z.B. TNF α ebenso induzierbar ist (**Kapitel 16**; Walther et al., 1997). Damit sollte die Anwendung eines Konstrukts getestet werden, welches unter der Kontrolle der mutierten MDR1-Promotorvariante Fremdgene induzierbar (konditionell) zur Expression bringt. Vor allem jedoch sollte geprüft werden, ob sich auch auf diese Weise durch die induzierbare TNF α -Expression eine Chemosensitivierung der Tumorzellen im Sinne einer Überwindung des MDR-Phänotyps (**Kapitel 4-6**) erreichen lässt.

Dafür wurden Konstrukte generiert, die das humane TNF α unter der Kontrolle der mutierten MDR1-Promotorvariante exprimieren. Es wurden stabil transfizierte Zellklone der humanen Tumorzelllinien HCT116 (Kolonkarzinom) und MCF-7

(Mammakarzinom) etabliert. Nach Behandlung mit den MDR-assoziierten Zytostatika Adriamycin, Vincristin und Taxol wurden deutlich gesteigerte TNF α -Niveaus gemessen (vs. unbehandelte Zellen). Zellen, die mit 5-Fluorouracil, einem nicht zur Gruppe der MDR-assoziierten Zytostatika gehörenden Substanz, inkubiert wurden, zeigten ebenfalls keine induzierte Zytokinexpression. Die Höhe der induzierten TNF α -Niveaus war abhängig von der Konzentration der eingesetzten MDR-assoziierten Zytostatika. Die Behandlung stabil-transfizierter Zellklone mit Adriamycin führte darüber hinaus zu deutlich gesteigerten Wachstuminhibitionen (vs. unbehandelten und vs. nicht-transfizierten Zellen); das Überleben der Zellen war somit deutlich vermindert, die Chemosensitivität erhöht. Damit wurde das Prinzip der durch Zytokine vermittelten Chemosensitivierung auch mit diesem gentherapeutischen Ansatz unter Kontrolle der Zytostatika-induzierbaren, mutierten MDR1-Promotorvariante verifiziert.

Kapitel 17

Das Ziel dieser Arbeit (**Kapitel 17**; Walther et al., 2000) bestand in der Testung dieses kombinierten Therapieansatzes einer Gen- und Chemotherapie im Tiermodell. Basierend auf den bereits beschriebenen in vitro-Ergebnissen (**Kapitel 4-6 und 14-16**) wurden humane Mammakarzinomzellen MCF-7 mit dem Konstrukt des TNF α -Gen unter der Kontrolle der mutierten MDR1-Promotorvariante transfiziert, stabil TNF α -sezernierende Klone generiert, und auf nude-Mäuse xenotransplantiert.

Die Behandlung der xenotransplantierten Mäuse mit Adriamycin oder auch mit Vincristin resultierte sowohl in gesteigerten mRNA-Expressionsniveaus des TNF α als auch in erhöhten Mengen des sezernierten Zytokins in den Tumoren (vs. nicht-transfizierten und vs. nicht-induzierten Tumoren) der Tiere. Bereits 4 h nach Zytostatika-Behandlung wurden induzierte TNF α -mRNA-Niveaus nachgewiesen. Diese zeitabhängige Zytostatika-Induktion erreichte die höchsten Werte des sezernierten Zytokins 48 h nach Behandlung mit bis zu 25-fach gesteigerten TNF α -Niveaus. Um Aussagen zur biologischen und damit therapeutischen Bedeutung dieses Therapieansatzes zu treffen, wurden die Tumorumfänge xenotransplanteder Tiere mit nicht-transfizierten und TNF α -transfizierten Konstrukten, entweder unter Kontrolle des CMV-Promotors oder der MDR1-Promotorvariante, bis zum 24. Tag nach Adriamycin-Behandlung miteinander verglichen. Während in Tieren mit Wildtyp-MCF-7-transfizierten Tumoren keine deutlichen Unterschiede im Tumorstadium mit und ohne Adriamycin-Behandlung beobachtet wurden, wurden signifikant verringerte Tumorumfänge nach Adriamycin-Behandlung in den Tieren nachgewiesen, die mit den MDR1-Promotor-

TNF α -Konstrukten transfiziert waren. Damit wurde auch in vivo der Beweis erbracht, dass Zytostatika über den MDR1-Promotor die Expression von Fremdgenen induzieren können. Diese induzierte TNF α -Expression resultierte in der Chemosensitivierung gegenüber Adriamycin mit der Folge der Wachstumsinhibition bis hin zur Verkleinerung der Tumoren.

Kapitel 18

Wie in den **Kapiteln 10-13** beschrieben, kann durch den Stressfaktor Hyperthermie die Expression von MDR-assoziierten Genen induziert/verstärkt werden. Deshalb sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob MDR1-Promotorsequenzen neben der Behandlung mit Zytostatika (**Kapitel 14-17**) auch durch die Behandlung mit Hyperthermie zur induzierbaren Expression therapeutischer Gene eingesetzt werden können (**Kapitel 18**; Walther et al., 2002).

Es wurden Konstrukte generiert, die sowohl ein Reportergen als auch TNF α als therapeutisches Gen unter der Kontrolle des MDR1-Promotors (vs. SV40-Promotor) beinhalteten. Humane Kolonkarzinom-Zelllinien wurden mit diesen Konstrukten transfiziert, und bei 41,5°C oder 43°C hyperthermiert. Hyperthermie führte ausschließlich in den Zellen zu induzierten Fremdgenexpressionen, wenn diese Gene unter der Kontrolle des MDR1-Promotors standen (vs. SV40-Promotor). So erfolgte die Hyperthermie-induzierte Reportergen-Expression temperaturabhängig mit höheren Werten in 43°C-behandelten Zellen (vs. 41,5°C bzw. 37°C). Hyperthermie-induzierte TNF α -Sekretionen wurden ebenfalls mit bis zu 7-fach gesteigerten TNF α -Expressionsniveaus gemessen. Damit war die prinzipielle Hyperthermie-Induzierbarkeit der Expression von Fremdgenen unter der Kontrolle von MDR1-Promotorsequenzen in in vitro-Modellen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die durch Hyperthermie-induzierte Menge an TNF α eine Chemosensitivierung der Tumorzellen gegenüber der MDR-assoziierten Zytostatika Adriamycin und Vincristin bewirkt. HCT15- als auch HCT116-Zellen, transfiziert mit TNF α unter MDR1-Promotorkontrolle, zeigten nach Hyperthermie deutlich verminderte Überlebensraten (vs. nicht-transfizierte und vs. nicht-hyperthermierte Zellen). Diese Ergebnisse weisen auf den erfolgreichen Einsatz von Hyperthermie und Genimmuntherapie in Kombination mit der konventionellen Chemotherapie hin; darüber hinaus wurde insbesondere der Benefit Hyperthermie-induzierbarer Expressionssysteme für therapeutische Gene deutlich.

Kapitel 19

In den bisher vorgestellten Arbeiten wurde der Promotor der MDR1-Gens analysiert und für Therapie-induzierte Fremdgenexpressionen angewendet. In dieser Arbeit (**Kapitel 19**; Lange et al., 2000) wurde die Frage gestellt, ob Genpromotoren weiterer MDR-assoziiierter Gene ebenfalls für die Konstruktion Therapie-induzierbarer Vektorsysteme geeignet sind. Von besonderem Interesse war in diesem Kontext der Promotor des MVP-Gens: MVP vermittelt im Gegensatz zu den ABC-Transportern MDR1, MRP1 und BCRP nicht den transmembranen ATP-abhängigen Zytostatika-Transport, sondern ist an nukleozytoplasmatischen Transportvorgängen beteiligt. Des weiteren unterscheiden sich die, wenn auch überlappenden, Spektren der Zytostatika-Kreuzresistenzen dieser MDR-assoziierten Gene und ermöglichen so potentiell den Einsatz weiterer Zytostatika für die Induktion von Fremdgenen über den MVP-Promotor.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden 5'-flankierende Sequenzen (bzgl. Transkriptionsstart) des MVP-Gens aus einer humanen Lungenkarzinom-Zelllinie SW-1573 amplifiziert, kloniert und sequenziert. Es wurden mehrere sequenzidentische Fragmente mit einer Länge bis zu 1881 bp identifiziert, die in Reporter-gen-Assays deutliche basale Promotoraktivitäten zeigten. Durch in silico-Analysen konnten mehrere Sequenzmotive identifiziert werden, die für die Bindung definierter Transkriptionsfaktoren und damit potentiell für die Vermittlung von Effekten externer Stressfaktoren predestiniert sind: so wurde eine invertierte CCAAT-Box (Y-Box) gefunden, die den Transkriptionsfaktor YB-1 binden kann, ein p53-Bindungsmotiv wurde identifiziert, ein Sp1-Ort, und eine E-Box-like Sequenz zur potentiellen Bindung von c-myc. Darüber hinaus wurden alternative Splice-Varianten in der 5'-untranslatierten Region der MVP-mRNA nachgewiesen.

Kapitel 20

Auf der Grundlage der im **Kapitel 19** identifizierten Sequenzen des MVP-Promotors erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung der Zytostatika-Induzierbarkeit des MVP-Gens und die Analyse der transkriptionellen Regulation unter Verwendung definierter MVP-Promotormutanten (**Kapitel 20**; Stein et al., 2002, eingereicht).

Neben den MDR-assoziierten Zytostatika Adriamycin, Vincristin und Cisplatin war auch das nicht zu dieser Gruppe zählende 5-Fluorouracil interessanterweise in der Lage, die endogene Expression von MVP auf beiden Ebenen zu induzieren. Es wurden 8 Deletionsmutanten des MVP-Promotors generiert, die unterschiedliche potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren tragen. Durch Transfektion der MVP-

Promotormutanten wurde in verschiedenen Reporter-gen-Assays die Induzierbarkeit definierter Promotorfragmente durch 5-Fluorouracil bestätigt. Bindungsstudien zeigten, dass der Transkriptionsfaktor YB-1 an die Y-Box der MVP-Promotors bindet; ebenso konnte für p53 eine Bindung an das p53-Bindungsmotiv nachgewiesen werden. In stabil YB-1-transfizierten Tumorzellen, transient sekundär-transfiziert mit den MVP-Promotormutanten-tragenden Reporter-gen-Konstrukten, wurden überraschenderweise gesteigerte basale Reporter-gen-Expressionen (vs. nicht-transfizierten Zellen) gefunden. Darüber hinaus erfolgte durch die Behandlung mit 5-Fluorouracil eine deutliche Induktion der Reporter-gen-Expression in den YB-1-Transfektanten. In p53-Transfektanten wurden diese Effekte nach sekundärer Transfektion mit den MVP-Promotormutanten jedoch nicht beobachtet. Weitere Bindungsstudien zeigten, dass YB-1 mit p53 um die p53-Bindungsstelle im MVP-Promotor kompetiert. Damit wurde nachgewiesen, dass die 5-Fluorouracil-induzierte Expression des MVP-Gens über die Bindung des Transkriptionsfaktors YB-1 an definierte Motive des MVP-Promotors vermittelt wird. MVP-Promotorsequenzen stellen damit eine alternative Möglichkeit für Therapie (5-Fluorouracil)-induzierbare Vektorsysteme dar.

2. Zusammenfassende Wertung

Zytostatika- und Zytokin-regulierte Expression MDR-assoziierter Gene

Als Ergebnis dieser Arbeiten (**Kapitel 2-9**) wird zusammengefasst, dass sowohl Zytostatika als auch Zytokine modulierende Einflüsse auf die Expression der MDR-assozierten Gene MDR1, MRP1 und MVP zeigten. Die Behandlung der Tumorzellen mit Zytostatika wie Adriamycin resultierte vorwiegend in induzierten Expressionen des prominentesten Vertreters der MDR-assozierten ABC-Transporter, des P-Glykoproteins. Basierend darauf stellt die Intervention der MDR1-Genexpression auch das hauptsächliche Ziel zur Überwindung des klassischen MDR-Phänotyps dar.

Die eingesetzten Zytokine zeigten hinsichtlich der Expressionsmodulation unterschiedliche Einflüsse auf die untersuchten MDR-Gene; während z.B. TNF α zur Down-Regulation der Expressionen von MDR1 und MVP führte, steigerte es die Expression von MRP1. Die Applikation der Zytokine (extern vs. Gentransfer) beeinflusste diese Effekte nicht. Trotz der diversen Zytokin-Effekte wurden jedoch interessanterweise durch die externe Applikation von Zytokinen als auch durch

Gentransfer der Zytokingene wiederholt Chemosensitivierungen der Tumorzellen gegenüber den MDR-assoziierten Zytostatika Adriamycin und Vincristin erzielt. Diese Ergebnisse zur Zytokin-vermittelten Überwindung des MDR-Phänotyps, vorwiegend basierend auf der Expressionsintervention des MDR1-Gens, unterstreichen die dominante Rolle der MDR1-Genexpression bei der klassischen MDR. Darüber hinaus weisen sie auf die nützliche Inklusion definierter Zytokine in etablierte Chemotherapieprotokolle hin, wie es z.B. im klinischen Setting der hyperthermen isolierten Extremitätenperfusion mit TNF α bereits angewendet wird (**Kapitel 13**).

Ergänzend zur Zytokin-vermittelten Überwindung des klassischen, vorwiegend MDR1-bedingten MDR-Phänotyps demonstrierten die Resultate unter Verwendung BCRP-spezifischer Ribozyme deren Potential zur Überwindung des BCRP-bedingten, atypischen MDR-Phänotyps. Der Benefit der Gentherapie mit Ribozymen als Behandlungsoption zur Steigerung der Effizienz konventioneller Therapien maligner Erkrankungen bleibt in fortführenden Arbeiten zu prüfen.

Hyperthermie-regulierte Expression MDR-assoziiierter Gene

Zusammenfassend wird aus diesem Teil der Arbeiten (**Kapitel 10-13**) geschlussfolgert, dass prinzipiell die Expression aller hier untersuchten MDR-assoziierten Gene, der ABC-Transporter MDR1, MRP1 und BCRP, als auch des MVP, durch Hyperthermie temperatur- und zeitabhängig induzierbar ist. Diese Hyperthermie-Induktion wird für MDR1 und MRP1 über den Transkriptionsfaktor YB-1 vermittelt. Sie erfolgt zeitnah zum Stressereignis und kann auf beiden Expressionsebenen verfolgt werden. Trotz Hyperthermie-induzierter Expression funktioneller MDR-Proteine wurde keine Verstärkung des MDR-Phänotyps beobachtet; statt dessen wurde meist eine Chemosensitivierung gegenüber MDR-assoziierten Zytostatika festgestellt. Diese Befunde können neben Hyperthermie-bedingter Alterationen der Zellmembranen auch auf veränderte posttranslationale Modifikationen und/oder veränderte Topologien von MDR-Proteinen in der Zellmembran zurückgeführt werden.

In der klinischen Situation konnte anhand der verfügbaren Biopsien zweier unterschiedlicher Tumorlokalisationen, die jeweils den Einsatz der Hyperthermie im Kontext multimodaler Behandlungsregimes gestatten, kein direktes, generelles Risiko einer MDR1- oder MRP1-vermittelten, Hyperthermie-bedingten Induktion/Verstärkung einer MDR beobachtet werden. Die Verifizierung dieser Beobachtungen für ABC-Transporter mittels Analyse zeitnaher Biopsien nach Hyperthermie mit höheren Temperaturen (>41,5°C) sowie die weitere Untersuchung der Hyperthermie-Induktion

von MVP stellen anspruchsvolle und klinisch relevante Themen für fortführende, zukünftige Arbeiten dar .

Analyse MDR-assoziierter Genpromotoren und deren Therapie-induzierte Regulation

Basierend auf den in diesem Teil vorgestellten Arbeiten (**Kapitel 14-20**) wird festgestellt, dass Promotoren MDR-assoziierter Gene wie MDR1 und MVP durch unterschiedliche Therapie-relevante Faktoren wie Zytostatika und Hyperthermie induzierbar sind. Spezifische Sequenzmotive dieser Promotoren sind für die Stressfaktor-induzierte Bindung definierter Transkriptionsfaktoren wie YB-1 verantwortlich. Mutationen in diesen Sequenzbereichen modulieren jedoch die Induzierbarkeit (**Kapitel 14,15,20**). YB-1-Verfügbarkeit und Bindung an definierte Promotorsequenzen spielen eine entscheidende Rolle bei der 5-Fluorouracil-induzierten Expressionssteigerung des MVP-Gens (**Kapitel 20**), sind aber auch in die Hyperthermie-induzierte Expressionssteigerung der Gene MDR1 und MRP1 involviert (**Kapitel 10**). Damit wird die besondere Rolle von YB-1 in der Stress-induzierten Regulation MDR-assoziierter Gene deutlich. YB-1-gerichtete Interventionsstrategien könnten in fortführenden Arbeiten wertvolle Möglichkeiten für alternative MDR-Überwindungsstrategien eröffnen.

Die Nutzung Therapie-induzierbarer Promotorsequenzen MDR-assoziierter Gene steht besonders im Mittelpunkt des Interesses. So wurde neben der Induzierbarkeit mit einem breiten Spektrum an Zytostatika in verschiedenen in vitro- und in vivo-Modellen (**Kapitel 14-17**) auch die Möglichkeit eröffnet, derartige MDR-Genpromotorsequenzen für die konditionelle Fremdgenexpression durch Hyperthermie einzusetzen (**Kapitel 18**). Dieser therapeutische Ansatz wird gegenwärtig im in vivo-Modell evaluiert.

Der Einsatz induzierbarer Promotoren unterschiedlicher MDR-Gene wie MDR1 (**Kapitel 14-18**) und MVP (**Kapitel 19,20**) erlaubt somit generell die Anpassung an etablierte Behandlungsprotokolle verschiedener Tumorentitäten. So könnten diese Promotorelemente zur Zytostatika-induzierbaren Expression therapeutisch relevanter Gene in Chemotherapieprotokollen eingesetzt werden, die MDR-assozierte Zytostatika wie z.B. Adriamycin oder Vincristin, aber auch nicht-MDR-Zytostatika wie z.B. 5-Fluorouracil beinhalten. Darüber hinaus ist der Einsatz dieser Konstrukte auch im Kontext der Hyperthermie sinnvoll. In fortführenden Arbeiten bleibt die erfolgreiche Anwendung von Therapie-induzierbaren Promotorsequenzen der MDR-assozierten Gene im Kontext einer Gentherapie multimodaler Behandlungsschemata maligner Erkrankungen zu prüfen.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich sehr gern all denen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Peter M. Schlag. Er gab mir durch seine langjährige Unterstützung, sein kontinuierliches Interesse, sowie durch kritische Diskussionen die Möglichkeit, diese Arbeit zu erstellen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin bedanken, ohne deren Unterstützung, Engagement und Kooperation diese Arbeit nicht hätte entstehen können; mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Detlev Ganten, PD Dr. Iduna Fichtner, PD Dr. Hans-Dieter Royer und Dr. Wolfgang Walther. Für experimentelle Anregungen und kritische Diskussionen danke ich den Post-Doktoranden, Doktoranden und Diplomanden unseres Labors, insbesondere Dr. Karsten Jürchott, Holger Schwabe, Christian Lange, und Dr. Stephan Bergmann. Für die große Einsatzbereitschaft und exzellente technische Unterstützung danke ich besonders Frau Lieselotte Malcherek.

Bei den Kollegen der Robert-Rössle-Klinik der Charité, insbesondere bei Prof. Dr. Peter Hohenberger, PD Dr. Beate Rau und Dr. Wolfgang Haensch, möchte ich mich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit bedanken. Den Kollegen des Instituts für Pathologie der Charité, besonders PD Dr. Hermann Lage und Prof. Dr. Manfred Dietel, sowie des Instituts für Biochemie der Charité, besonders Dr. Ulrike Kuckelkorn, Prof. Dr. Siegfried Prehn und Prof. Dr. Peter M. Klotzel, gilt mein Dank für deren freundliche Unterstützung.

Meinen Kooperationspartnern im Ausland, die über Jahre meine wissenschaftliche Arbeit mit Anregungen und Diskussionen, aber auch mit der Ermöglichung von Forschungsaufenthalten unterstützt haben, gilt mein herzlicher Dank. Ganz besonders möchte ich Dr. Robert H. Shoemaker, National Cancer Institute, Frederick, MD, für seine langjährige intensive Unterstützung danken, ohne die viele der präsentierten Daten nicht hätten generiert werden können. Mein Dank gilt insbesondere auch Prof. Dr. Rik J. Scheper, Freie Universität Amsterdam, für dessen kontinuierliches Interesse und hervorragende Kooperation.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten im In- und Ausland danke ich der Alexander von Humboldt-Stiftung, Bonn, der Fogarty International Foundation, Bethesda, MD, der Science Applications International Corporation, Frederick, MD, der Europäischen Union, Brüssel, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, dem SFB 273 Hyperthermie, Berlin, dem Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, Essen, der Berliner Krebsgesellschaft sowie den Kooperationspartnern in der Industrie.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: bei meinem Mann Wolfgang und bei meinem Sohn Philipp Maximilian für deren Verständnis und Unterstützung in wirklich jeder Hinsicht. Aber auch meinen Eltern gilt mein ganz besonderer Dank, die mir meine schulische und universitäre Ausbildung unter großen Opfern ermöglichten.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

26. November 2002
Datum

.....
Unterschrift